

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-046566

(43)Date of publication of application : 27.02.1991

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 33/536

G01N 35/02

(21)Application number : 02-179709

(71)Applicant : MILES INC

(22)Date of filing : 09.07.1990

(72)Inventor : LOWRY J MESSENGER  
CHRISTINE D NELSON  
FRANK W WOGOMAN  
YIP KIN-FAI

(30)Priority

Priority number : 89 378039

Priority date : 11.07.1989

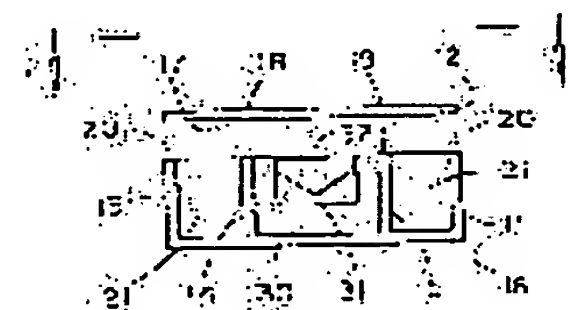
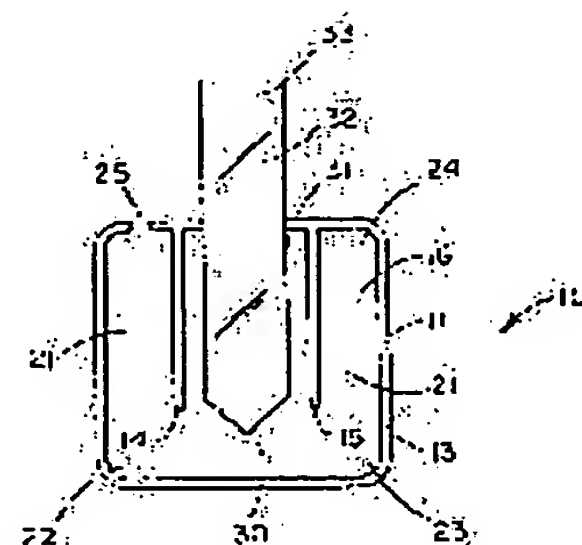
Priority country : US

(54) REACTION CASSETTE FOR PERFORMING SEQUENTIAL ANALYTICAL TEST THROUGH NONCENTRIFUGAL AND NONCAPILLARY OPERATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To facilitate the operation and the work by bringing the corner of a square cassette having a fluid stirring means into contact with a reagent region thereby oscillating a unit for stirring a liquid mixture.

CONSTITUTION: A unit 10 is a square cassette having a horizontal rotary shaft and after an analytical reagent is set in a body part 11, the body part 11 is enclosed by a cover 12. A sidewall 13 defines a reaction path 21 along with the cover 12 and a supporting wall 16 and the reaction path 21 forms corners 22-24. The corners 22-24 provide means for causing stirring through contact thus stirring up a liquid mixture and further provides an observation region for detecting and determining the response of a reaction mixture. A sample is introduced through an injection port 25 into the reaction path 21 by means of a pipet. The unit 10 is provided with a liquid supply/store unit 30 and a liquid reagent flows from a storage unit body 31 into the reaction path 21. More specifically, operation of the unit 10 relies upon the gravitational fluidity along the reaction path 21.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-46566

⑬ Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)2月27日

G 01 N 33/543  
33/536  
35/02

Y 7906-2G  
F 7906-2G  
Z 7403-2G

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全19頁)

⑮ 発明の名称 非遠心性及び非毛細管性の操作による逐次的分析試験実施用の反応カセット

⑯ 特 願 平2-179709

⑰ 出 願 平2(1990)7月9日

優先権主張 ⑱ 1989年7月11日 ⑲ 米国(US) ⑳ 378039

㉑ 発 明 者 ローリー・ジェイ・メ アメリカ合衆国、インディアナ州、46530、グレンジャー、ツセンジャー、グリーン・オークス・コート 17453

㉒ 出 願 人 マイルス・インコーポ アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、エルクハート、レーテッド、ミルトル・ストリート 1127

㉓ 代 理 人 弁理士 津 国 肇 外1名  
最終頁に続く

#### 明 細 書

##### 1. 発明の名称

非遠心性及び非毛細管性の操作による逐次的  
分析試験実施用の反応カセット

##### 2. 特許請求の範囲

1 実質的に水平な回転軸を具備し、

(1) 液体試料を、反応カセットに導入する注  
入手段、及び

(2) 該注入手段と開放液体流通関係にあつて、

(i) 分析対象物と相互作用して、該分析対象物  
の関数として検出可能な応答を生ずる分析試薬を  
組み込んだ試薬域、及び(ii) 接触して該液体を  
攪拌するに充分な、該反応路に沿った重力により  
該液体の流動を攪乱する手段(それにより、該反  
応路で処理された液体は、該反応器を該水平軸の  
周囲に回転させることによって、該反応路に沿っ  
た重力で移動させられ、該試薬域及び該流動攪乱  
手段に接触できる)からなる反応路を含み、  
該流動攪乱手段が、好適には、液体の重力攪動が  
該液体との接触で、方向を再び変えるように形成

された、該反応路内の障害物又は収斂点、例えば  
該壁部が約90度の角度をなしている角部よりな  
る、分析反応を行なつて液体試料中の分析対象物  
を測定するための分析用反応カセット。

2 (a) 液体試料を、その注入手段により  
反応カセットの反応路に導入、該反応路内で液体  
反応混合物を形成し；

(b) 該液体混合物を、該反応路に沿った重力  
により移動せしめて、反応域で分析試薬と接触さ  
せ、流動攪乱手段と接触させるため、該反応カセ  
ットをその水平軸の周囲に回転させ；

(c) 該水平軸の周囲で該反応カセットを振動  
させて、該混合物中で該液体混合物と分析試薬を  
完全に混合するに充分な程度、該流動攪乱手段と  
接触せしめて該液体混合物を攪拌し；

(d) 該液体混合物内で検出可能な応答を測定  
する工程よりなり、請求項1記載の反応カセット  
を使用して、液体試料中の分析対象物を測定する  
分析反応方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## [発明の背景]

本発明は、分析対象物と、該測定実施の操作段階に必要な一種以上の分析試薬の間の液体分析反応を含む、試料中に存在する分析対象物の量を測定する分析試験法に関する。特に、本発明は、一種以上の前記の分析試薬を混合させ、容器中の液体を非毛細管的な運動によって該分析反応を実施するため、非遠心的な力によって操作することができる、逐次的な分析反応を実施する反応容器に関する。

産業、環境ならびに特に医学的に重要な分析対象物を測定するため、各種の分析法が開発されてきた。多くの場合、該分析法は液状の反応混合物の処理を含み、大抵の場合、試験のプロトコールを実施するために逐次的に行わねばならない多くの分析反応を必要とする。各種の操作、例えばピペットでの採取、混合及び攪拌、インキュベーションの期間、遠心分離、分離工程など、は誤差を起こし易く、不正確な結果を生じる可能性がある。

3

の方向の機能として、各遠心分離工程に選ばれた容器の角の位置で行なわれる。

遠心分離の工程を必要とせずに分析反応を行なう各種の装置が提案されてきたが、かかる装置にはやはり前記の問題を含む数多くの厄介な操作工程が必要である。例えば、米国特許第 4,890,801 号の明細書は、導管及び脆い封印材を施して相互を分離した多数の試薬貯留器を規定しており、一方の側に取り付けられた薄くて柔軟な膜を具備する平板よりなる、手動で操作される装置を記載している。分析試験管は、その導管の一つの末端に取り付けられ、試料導入の貯留器は導管の他の末端に取り付けられている。平板は基部材に収容され、ローラーバーを有するおおいの部材は基部材の上に取り付けられており、ローラーバーは平板の表面とかみ合っている。装置を操作する場合、カバーは平板に関して回転し、ローラーバーは貯蔵室に圧を加え、脆い封印を破壊し、試薬をそれぞれの貯蔵室から導管に強制して試験の目的を達成する。

5

該操作の自動化若しくは簡略化を企図して各種の装置が開発されてきたが、かかる装置は、往々にして取り扱いが困難で、かつその取り扱いには訓練された熟練技術者を必要とする。いくつかの場合に、このような装置は、試験のプロトコールを実施する過程で、特に検体の移動及び混合の工程で数多くの手動による操作工程を、やはり必要とする。

例えば、米国特許第 4,673,653 及び 4,743,558 号の各明細書は、多くの遠心分離の工程を必要とする、区画されたプラスチック製容器を使用した液体試料の生物学的分析実施法を記載している。この容器は、液体試料の貯蔵室、検量用の小室、各種の反応液のための多数の貯蔵室、及び反応槽からできている。各種の室、検量用の小室及び反応槽は、遠心力により、それらの間に液体を移動させるため毛細管によって相互に連結されている。生物学的分析の実施に際して、連続的な遠心分離の工程は、装置内に配置された液体の操作を容易にするため、遠心力の方向に対して特殊な毛細管

4

同様に、前記の遠心分離及びその他の厄介な操作工程で示された諸問題を克服せんとして提案された分析反応を行なう別の装置は、やはり複雑であり、ある場合には、製作に費用が掛かり過ぎる。さらに、このような装置は、その装置に配置された分析試薬を、試料と混合するための簡単に便利な方法を提供することにはならない。

例えば、ドイツ特許公開第 3706718 号の明細書は、構成要素として、不溶性試薬と混合され、最初の測定室に配置された第一の毛細管作用のあるキャリアー、最初の予備室で可溶性試薬と混合し、測定室で毛細管接触を起こす第二の毛細管作用のあるキャリアーよりなり、不均一反応を行なう装置を記載している。装置内に充填を開始することで、試料、次いで洗浄又は排出液を受け入れる最初の導入室は、毛細管構造によって予備室に連結され、測定室はさらに液体が一定の重力の下でのみ流動することができる毛細管構造によって排出室と連結されている。毛細管構造は、格子の開放部の上に到達した液体の表面張力により、初めに

6

は液体を通過させず、重力で引き起こされる予め定めた圧の下でのみ液体の通過を行なわせる本質的に薄い網状組織である。

かかる毛細管装置の別な態様は、さらに別の導入室及び充填開放部、第三の毛細管によって混合室と連結される第二の予備室、その混合室は第四の毛細管によって測定室に連結している、よりなるものとして記載されている。噴出口は、混合室内に突き出しており、混合室を傾ける時、第三の毛細管から入る液体は混合室内に流入する。第一の毛細管キャリアーを含む測定室に連結し、毛細管流動のための静的な一方向のバルブによって、最初の測定室に連結している第五の毛細管も記載されている。毛細管キャリアーは、所定の時間に液体を吸引する吸引の高さによって規定され、それらの吸引容量及び吸引力によって特徴付けられる。

しかしながら、かかる毛管装置は、その装置の組立のために多くの内部の構成要素を必要とし、往々にして高価で複雑な製法となる。さらに、

7

#### [発明の概要]

本発明は、自給式の反応カセット又は容器、及び液体の試験用混合物において、分析対象物及び分析対象物と反応して検出可能なシグナルを生ずる一種以上の分析試薬との間での、逐次的な分析反応よりなる分析試験法を実施する方法を提供するものである。この装置は、多くの混合工程、及びその他の煩雑な作業工程、例えば試料及び液体の試験用混合物のピペットでの採取及びインキュベーションを通常必要とする、免疫学的試験法を実施するのに特に有用である。所要の逐次的な試薬の添加及び混合の工程は、(a)測定用に、各種の機能的工程を実施するために設計された装置内で、液体混合物の重力による坡又は区域への流動を起こすため、装置を比較的低速度で非遠心的に回転させ、(b)流動を攪乱する手段、例えば四角形のカセットの角と接触させて液状混合物を攪拌する装置を振動させることによって、装置内で達成させられる。

本発明の装置は、特殊な逐次的な分析試験法を

8

装置内を循環する液体の移動は、キャリアー素材の吸引力に依存するので、適当に選択されない場合には、非能率で信頼性のない結果が得られることになる。

従って、液体の分析混合物内での逐次的な分析反応を実施するために、必要な試料の混合及び移動の工程に対する装置を提供するのが、本発明の目的である。

本発明の別の目的は、液体の遠心的又は毛細管的移動によらない、逐次的な分析試験法実施のための装置を提供することである。

本発明の、さらに別の目的は、最小数の作業工程だけを必要とし、操作及び作業が容易である逐次的な分析試験法を実施する装置を提供することである。

さらに、本発明の別の目的は、医師の診療室又は小規模な臨床試験室で容易に利用可能な、逐次的な分析試験法の実施のための装置を提供することである。

8

実施するために必要な一種以上の分析試薬を包含している。液体の試験用混合物は、装置内で形成され、非毛細管的な操作によって分析試薬と、逐次的に接触及び反応が行なわれ、比較的低速度で攪拌、混合されて生成した液体混合物は、外部からの操作工程を加えることなく、測定が完了される。この装置はまた、分析対象物と分析試薬との間の分析反応によって生成した検出可能な応答を都合良く測定し、測定の後若しくはその過程で、一種以上の検出可能な応答が生じた場合、容易に装置を操作し、測定の過程で装置内で都合良く測定される。

特に、本装置は、実質的に水平な回転軸、好適には、実質的に中心の回転軸を具備するカセット又は容器であり、反応路、及び試料を反応路に導入するために、反応路に開放された液体通路への、好適には注入口の形での、注入機構よりなる。反応路は、好適にはその乾燥形態で、少なくとも分析試薬を組み入れた一つの試薬帯、及び液体混合物を、それと接触させて十分に混合するための攪

10

押で、反応路に沿った重力による液体混合物の流動を攪乱する手段を含む。好適な態様において、本装置は、さらに注入手段により、好適には挿入され、それによって注入手段を閉鎖することができる毛細管装置の形態で、試料を反応路に導入する手段を含む。さらに好適な態様において、本装置は、分析試験法を実施する過程で反応路に液体試薬を導入するために操作することが可能な、液体試薬を組み入れた液体供給手段を含む。好適には、液体供給手段は、外部から操作でき、取り外しのできる、液体を過さないシールで閉鎖された貯留体の形態である。

流動攪乱手段は、反応路に沿って試薬帯から十分に離れた位置にあり、液体混合物が流動攪乱手段と同時に接触することなしに試薬帯に存在するか、又は流動攪乱手段と試薬帯が相互にすぐ近くにあり、液体混合物が流動攪乱手段及び試薬帯と同時に接触して存在するかの何れかである。装置内の液体が流動攪乱手段と接触するような、装置の激しい振動は、液体の乱れを十分に大きくして

11

つの分析試薬から他の試薬又は、例えば、キュベットに移す必要なしに、装置を単に回転、振動することによって行なわれる。

本発明の装置を用いる分析定量法は、一般に、試料を注入手段(inlet means)により反応路に導入することによって行なわれる。液体の試験用混合物が形成され、試薬域に組み込まれた分析試薬と接触させられる、好適には、装置を水平軸の周囲に回転することにより、液体の試験用混合物は重力により反応路に沿って試薬域に移動され、そこに組み入れられた分析試薬とさらに液体混合物を形成する。液体混合物若しくはその後の混合物を形成するため、装置を水平軸の周囲で振動し、前記のごとく、液体混合物は流動攪乱手段と接触して攪拌され、それによって液体混合物が混合される。その後、液体混合物中の検出可能な応答が測定される。

本発明の好適な態様により、反応路は、反応路に沿って流動する液体と接触するように配置され、一種以上の別の分析試薬を組み入れた別の試薬域

13

液体を攪拌、混合する。好適には、流動攪乱手段は、反応路の周囲及び内側の壁よりなり、これらの壁は液体の流動が液体の接触で方向を変えるように配置されている。好適な態様において、壁部は反応路に一個以上の角ができるように配置され、各角は約75度ないし約105度、好適には約90度の角度をなし、適切な流動攪乱手段として作動する。一個以上の角は、また検出可能な応答を検出し、測定できる観察域として役立たせることができる。

本発明では、反応路で処理される液体の試験用混合物は、装置を水平軸の周囲に比較的ゆっくり回転させることにより、一個以上の試薬帯と流動攪乱手段の間を、重力によって反応路に沿って移動させられる。したがって、液体の試験用混合物が装置内で形成されると、液体の試験用混合物と分析試薬との攪拌及び混合よりなる分析試験法は、検出可能な応答を検出、測定のために、さらにピペットでの採取、遠心分離、その他の煩雑な操作工程を行なうことなく、液体の試験用混合物を一

12

を含み、液体試薬は、中心に配置された上記の液体供給手段に含まれる。分析試験法は、試料を反応路に導入し、液体試薬を反応路に導入することによって行なわれる。特殊な試験プロトコールによつては、液体試薬が導入され、液体試薬が試薬域の一種以上の分析試薬と接触する前に、試料と混合することができる、又は後から導入してもよいことは明らかである。何れの場合にも、装置を水平軸の周囲に更に回転させ、別の液体混合物を形成し、上記の流動攪乱手段によって、液体混合物は攪拌、混合される。

後で詳細に記載するように、本発明の装置は前記の分析試験法に限定されるものではなく、実際に所望の順序で多くの操作工程及び多数の分析定量試薬を含む、如何なる逐次的な分析試験法を行なうのにも使用され得る。さらに、反応路に沿って作られた開放液体通路は、水平軸の周囲に装置を回転することによって一種以上の別な検出可能な応答の測定を可能にする、即ち、一回の測定の過程で複数の測定を行なうために、液体の試験用

14



混合物を重力によって反応路に沿って一個以上の観察域に移動させることができる。

〔好適な態様の説明〕

第1図 (Fig. 1) 及び第2図 (Fig. 2) において、本発明の装置10 (第1図) は、好適には実質的に水平な回転軸を有する実質的に四角形のカセット又は容器であり、蓋部12で閉ざされた開放した本体部11を含む (第2図)。通常、カセットは、およそ3 cmないし15 cmの高さと幅、0.25 cmないし2 cmの厚さを有しているけれども、カセットの外側の大きさは重要ではない。特に適当なカセットは、約8 cmの高さと幅、約1 cmの厚さを有するものである。本体部11及び蓋部12は、以下に詳細に記述するように、カセットの組立てに先立ち、好適には一種以上の分析試薬を組み入れるため、別個な構成部分として設けられている。分析試薬を本体部11に組み入れた後、本体部11を蓋部12で密閉し、次いで接着、レーザー若しくは音波処理で密接、又は流体を通さないシールの分野で公知の方法によって固定する。

15

の損失を防ぐため、装置10内に試料を導入した後、注入口25には栓を付け、ふさぎ、若しくは閉じる。

本発明によれば、一種以上の分析試薬は、反応路21に沿って配置された試薬帯に、好適には乾燥した形態で、角22、23、24に近い区域、又は、一般にそれらの間の区域の何れかに組み入れ得る。何れの場合にも、反応路21に配置された液体は、装置10を水平軸の周囲に回転することによって反応路21に沿って、角22、23、24の間を重力によって自由に移動させることができる。反応路21に沿った試薬帯に一種以上の分析試薬を混入した上に、装置10は、分析測定法用の緩衝液及び/又は液体試薬を入れるのに適合した、好適には約0.25 mLないし約1.0 mL、さらに好適には約0.4 mLないし1.0 mLの液体供給貯留器30を含んでいる。液体供給貯留器30は、シール又は膜32で流体の通らないように密閉した貯留器本体部31よりなる。膜32は、各種の材料から、好適には流体を通さない様に貯

17

本体部11は、周囲の側壁13及び第一並びに第二の内壁14と15よりなり、それぞれを外部の支持壁16に対して大体垂直に配置し、配備した。側壁13及び第一並びに第二の内壁14及び15は大体高さが同じなので、本体部11を蓋部12で閉じる際、蓋部12の内表面17を、第一及び第二の内壁14と15の上縁18と19、側壁13の上縁20に、確り載せて流体を通さないように密封する。側壁13は、蓋部12及び外部の支持壁16の隣接部と共に、反応路21を形成する。反応路は側壁13の周辺に広がり、第一、第二、第三の角22、23、24を形成している。角は、それと接触して攪拌を起こし、本発明による液体混合物の流動を攪乱する手段をなしており、さらに、液体の反応混合物が表す検出可能な応答を検出、定量するための観察域として役立つ。注入口25は、側壁13の中にあり、反応路21の基部に近い末端に配置され、例えばピペットなどで反応路21に、試料を導入する。好適には、測定の過程及びその後での、装置10の操作で液体

16

留器本体部31を密閉することのできる、本質的に操作可能で柔軟な素材、例えばこの分野で公知の流体を通さないシールを作り、かつ容易に除去し得る接着剤から選ばれる。それによって、液体の試薬は、貯留器本体部31から下がり、反応路21に自由に流れ込む。以下に詳細に記述するように、膜32の末端33は、例えば装置10から一方の方向に引き離され、又は貯留器本体部31から膜32を除去又ははがし、それによって貯留器本体部31に含まれた液体試薬を反応路21に導入する。この分野で公知のその他の装置が、装置10に組み込まれ、上記のような液体試薬を導入する液体供給系として利用され得ることは、当然自明のことであろう。例えば、液体試薬を含む管状容器及び往復運動をなすプランジャーよりなる注射器様の装置 (図示せず) は、代わりとして、装置10に組み込まれてもよく、必要に応じて、プランジャーは反応路21に液体試薬を入れる作動をなす。

ここに記載したごとく、本発明の装置10の作

18

動は、液体の實質上自由で非毛細管性の、反応路 21 に沿った重力作用の流動に依存している。この分野に精通した技術者によって理解されるように、かかる自由な重力作用の流動は、表面張力、エアポケット、及びその他の物理現象によって実際に阻止される、後者の現象は液体が一種以上の固体表面と現実接触した場合、又は、例えば毛細管、管などに置かれた場合に往々にして起こるものである。従って、装置 10 における液体のかかる自由な重力作用の流動は、反応管 21 の開放部の内径、及びそこに置かれた液体の相対的な容量に依存する。装置 10 の内径は、通常、装置 10 のあらゆる場所で液体が操作されるように調整され、同時に、液体を流出させるに十分な大きさである。装置 10 の寸法は、好適には大体図面に示した大きさであり、前記のごときものであるけれども、上記の問題を理解しているこの分野に精通した技術者は、装置 10 の寸法を変更、又は装置内での液体の自由な重力作用の流動のための手段を講じることができる。例えば、装置 10 は、

18

該操作の過程で起こるその他の物理現象を、實質上、阻止し、水和性又は親水性の表面を生成するために、この分野で公知の方法で処理され得る。かかる表面処理は、プラズマエッチング及びプラズマ重合のようなプラズマ処理、コロナ放電、湿式の化学処理、及びこの分野で公知の被覆加工技術などであるが、これらに限定されるものではない。

カセット内で液体混合物を、ある位置又は場所から別の、例えばある試薬帯から別の、又はある試薬帯から混合若しくは観察域に移動させるために、装置 10 は、通常、反応路 21 に沿った液体の移動が本質的に非遠心的であり、實質的に重力のみによるものであるような遅い速度で、水平軸の周囲を回転させられる。同様に、カセットの回転は、360°以下の回転、又は装置の複数の回転を含むものであるけれども、通常、装置 10 は實質上、短い距離又は変位で、装置内に配置された液体又はその混合物の移動が、該液体に加えられた重力の結果であるように回転する。例示の

21

液体が装置内で操作されるにつれて、空気の漏れ、又は装置 10 から空気の漏出を行なわせるために開放されており、それによってエアポケットの形成を妨げ、又は液体の自由な重力作用による流動を阻止するその他の物理現象が起きるのを防いでいる。かかる通気又は開放は、装置 10 の一区域又は多区域に配置されているが、装置 10 から液体の流出を阻止するように構成されている。

液体又はその反応混合物の自由な重力作用による流動を付与するために、その容量は、上部及び下部壁の間又は隣接する壁の間、例えば隔壁 13 と第一及び第二の内壁 14 と 15 の間の区域の液体流動運動の区域を、實質的に占め又は満たしている容量より小さいのが好ましい。好適には、反応路 21 に存在する液体の全容量は、本発明の技術による装置 10 において重力による自由な移動を行なわせるためには、約 0.25 mL ないし約 1.0 mL であり、さらに好適には約 0.4 mL ないし約 1.0 mL であり得る。さらに、装置 10 の表面は、液体の自由な流動を行なわせ、表面張力、又は試

20

ためであるが、装置内で液体混合物をある位置から別な位置への移動をさせるための非遠心的な回転は、通常、約 25°より大きく、より普通には、約 45°より大きい回転角である。したがって、装置 10 内での液体又は液体混合物の重力作用による運動は、装置 10 の非遠心的な回転によってなされ、液体に加えられた重力よりも、實際上、大きい遠心力によってなし逃げられるものではない。好適には、液体移動の操作をなし逃げるために、装置 10 は、一般に水平軸の周囲を約 1 r.p.m. (毎分の回転数) ないし 60 r.p.m.、より好適には約 15 r.p.m. ないし約 40 r.p.m. の最高速度で回転させられる。このような非遠心性の回転速度は、装置 10 の大きさに当然依存しており、上記の問題を知っているこの分野に精通している技術者によって決定され得る。

他方、液体混合物を流動攪乱手段、例えば角 22、23 又は 24 と接触させて混合するために使用する振動は、一般に、短距離を 10 r.p.m. 以上の回転速度で行なわれる。好適には、この目的

22

のための振動の半周期で達成する回転の最高速度は、約15 r.p.m.ないし約40 r.p.m.である。有意に大きい回転角が与えられる場合、例えば最高の回転が与えられる場合、このような速度は有意な遠心力を液体混合物に与えることになるので、かかる振動は、上記のごとく、遠心力が流動攪乱手段で生ずる混合作用のみを促進するように、運動のかなり狭い範囲内に維持される。

反応路21の配置は、上記のごとく、限定のためのものではなく、本発明の技術によって、別の角又はその他の配置が、流動攪乱手段をして役立つように、又は別の試薬域若しくは場所に、反応路21に沿って置かれてもよい。したがって、本発明の特に好適な態様及び逐次的な分析測定法実施上の用途が、本発明のよりよき理解のために記載される。

第3～5図において、カセット及び予め測定した量の液体試料を装置40に導入する毛細管ホルダ41を示す。この装置の典型的な寸法は、第1図及び第2図の装置に関する上記のものと同じ

23

を閉鎖域58としている部分に更に拡張するため、第三の内壁50及び第四の内壁51を除去、修正又は再配置することがあり得るのは、明らかである。第二の角53は、各種の試薬と検体試料との反応によって生じた検出可能な応答を測定するための観察域として機能している。蓋部43及び側壁44は、吸光度又は濁り度のような検出可能な信号を正確に測定するため、略透明なキューベット窓57を備えて角53に作られている。

毛細管ホルダ41は、側壁44の入口58にはまって係合するような形状を有する末端58、及び試料採取用毛細管60を含む蓋部末端よりなる。毛細管60の液体容量は、装置40で行なう個々の分析試験操作によって変動する、つまり、予め決定された液体試料を装置40に導入する量で変わる。液体試料を装置40に導入する別の手段、例えばピペットなども使用できる。その場合、入口58は、測定の過程で液体の喪失が起きないように、例えば栓部材（図示せず）などで、同様に閉じることができることが、当然了承されるで

25

である。装置40は、既に記載したように流体を通さない様に蓋部43によって閉ざされる本体部42よりなる。本体部42は、周囲の側壁44、及び外側の支持壁47に対して、それぞれ大体直角に配置された第一及び第二の内壁45と48よりなり、上記のごとく、液体供給貯留器30は第一及び第二の内壁45と48の間に配置されている。側壁44は、蓋部43に隣接する部分及び支持壁47と一緒に、分析反応路49を形成し、その部分はU字型をなし、第二の内壁48と側壁44の間にあり、それらに大体直角をなしている第三の内壁50、及び第二の内壁48から延長している第四の内壁51によって形成されている。第一及び第二の角52及び53は、それぞれ反応管48に沿った側壁44によって形成される。第三の角54は、側壁44及び第三の内壁50によって形成され、第四の角55は、第二、第三、第四の内壁48、50、51によって、それぞれ形成される。装置40の中の閉鎖された区画56は機能していないが、必要に応じて、反応路49

24

あろう。

試薬帯61、62、63は、それぞれ第一、第三、第四の角52、54、55に配置され、個々の分析試験操作を実施するための分析試薬を組み入れる。分析試薬は、好適には実質上乾燥した、水溶性、懸濁可能な、又は可溶性の形態で試薬帯に存在し、この分野で公知の方法、例えば非共有結合の技術、吸収の技術などによって、それらが液体試料に逐次的に接触する、所望の順序に従って、反応路49に沿って組み入れることができる。或いは、例えば織物、吸湿性素材などのような吸収剤、又は試薬フィルムよりなる試薬パッドに、この分野で公知の分析試薬を組み入れ、液体と接触する反応路49の表面に取り付けられる。このような分析試薬が、そこに置かれた液体と接触せられる反応路49に、又はそれに沿った表面のいずれかに添加されてもよいのは勿論である。例えば、試薬帯は、反応路48に沿ったそれぞれの試薬帯の望ましい位置で、側壁44、外壁47、又は蓋部43の内表面に配置され得る。幾つかの

26



適用例では、試薬帯 62 を側壁 44 に配置する代わりに、試薬帯 63 を蓋部 43 の内表面に配置することが好ましい。試薬帯 62 及び 63 のかかる配置は、組み入れた試薬を反応路 48 に沿って移動した液体混合物と、大体同時に接触させることができる。

特に有利な試薬帯は、装置 40 の選ばれた区域の表面で、反応路 48 に沿って、大体扁平で浮き上がった構成部分又はメサ型の結節の形をなしている。個々の分析試薬の液体を該メサに適用することにより、分析試薬を試薬帯に組み入れ、そこに分析試薬の乾燥形態を形づくるため、液体部を蒸発させる。分析試薬の液体の形態での容量は、勿論、該メサの表面積に左右されるが、好適には約 0.002 ml ないし約 0.1 ml、さらに好適には約 0.005 ml ないし約 0.015 ml である。この分野に精通した技術者には自明のように、該メサに添加された液体の表面張力は、液体が隣接する表面に拡散するのを助け、離散若しくは局在化した区域を試薬帯として役立たせる。分析試薬を組

27

定するものではない。例えば、三個の試薬帯 61、62、63 が示されているけれども、その他の測定法にも装置 40 で、当然個々の測定条件に応じて足まる数の分析試薬を用いて行なわれる。さらに、一輪以上の反応混合物を装置の外部で最初に形成し、次いで検定を完了するために装置内に導入する場合には、装置には分析試験操作を実施するに要する分析試薬数が少なくてもよい。

第 3～6 図は、該装置の例示のための使用法である。ここに記載するように、装置の各種の回転及び振動運動は手動で行なわれるが、大抵の場合、適当な器械又は機械によって好適に行なわれる。試験を実施する通常の第一段階は、装置をホルダ機構に収め、装置 40 を含む器械は、角 53 を下向きにする（第 5 a 図）。次いで、液体試料、例えば生物学的流体は、毛細管 60 に組み入れられ、毛細管ホルダ 41 は開口部 58 を通って、定位位置の装置 40 に挿入される。このため毛細管 60 は第一の角 52 の略近い場所に位置し、毛細管ホルダ 41 の末端 58 は開口部 58 を閉ざす。

28

み入れるのにメサを使用するのは、装置 40 が試薬帯として役立つことのできる、予め計測された位置に一個以上のメサを付けたまま、容易に形作られるか、又は製造される製造過程で特に有用であり、従って装置 40 の組立て前に分析試薬を容易にかつ便利に組み込むことができる。

第 5 (a)～5 (h) 図において、上記のごとく装置 40 が水平軸の周囲を回転する場合、反応路 48 に沿った液体混合物の重力作用による流動及び混合、及び角 52、53、54、55 での逐次的な接触、及び反応路 48 に沿って試薬帯 61、62、63 に組み入れた分析試薬を、さらに例示するため各種の回転位置での装置 40 を示す。装置 40 の外側に示した実線の矢印は、水平軸の周囲における装置 40 の回転方向を示し、装置 40 内に書かれた破線の矢印は、装置 40 が水平軸の周囲を実線の方法に回転する時の液体の流動方向を示す。

第 5 (a)～5 (h) 図は、単に例示の目的のためであって、装置 40 への分析試薬添加の数、性質又は方法、又は装置 40 の回転の順序又は方向を限

28

第一の角 53 の場所にある側壁 44 の下部 64 は、図示するように好適に配置され、毛細管 60 が上記のごとく置かれた場合、毛細管 60 は、反応路 48 内の液体、例えば液体供給貯留器 30 から反応路 49 に導入されてた液体試薬、と効率よく接触することができる。

液体供給貯留器 30 に添加された液体試薬 70 は、第 5 a 図の実線の矢印で示すように、装置 40 から離れた方向に図 32 の末端 33 を引くことによって反応路 48 に導入される。液体試薬 70 は、第 5 a 図における破線の矢印が示す経路に沿って重力により、反応路 48 の角 53 に自由に流入する。ブランクの吸光度測定は、下方の角 53 の出発位置でのキュベット窓 57 で行なわれる。

次いで、装置 40 は、反時計の方向（矢印 A）に回転され、それによって液体試薬 70 は重力により反応路 48 に沿って移動し、第一の角 52、試薬帯 61 及び毛細管の試料管と接触するように振動（矢印 B）する（第 5 h 図）。本発明によっ

30

て、装置 40 が振動している間、第一の角 52 に衝突した液体試薬 70 によって起こされた乱流が、上記のごとく液体試料を毛細管 60 から除去し、試薬帯 81 内の第一の分析試薬の可溶性を起こし、第一の反応混合物 71 を生成するのは明らかである。必要ならば、装置 40 は時計方向及び反時計方向に交互に変えながら更に回転させてもよい（第 5 c 及び 5 d 図）、そこで、最初の反応混合物 71 は重力で、第一及び第二の角 52 と 53 の間にある反応路 48 に沿って移動させられ、そこで第一の反応混合物 71 は、最初の分析試薬の完全な可溶性又は懸濁を確実にするために、さらに攪拌され混合される。さらに、最初の反応混合物 71 中の分析対象物を分析試薬と十分に接触させるために予め設定した期間、装置 40 を静止位置に保持することができる。

最初の反応混合物 71 が、個々の試験用プロトコールによって測定されることが要求され又は望まれる最初の検出可能な反応又は測定可能な性質を示す場合、装置 40 は、最初の反応混合物 71

31

突にするために、装置 40 を振動させ、必要ならば、第二の反応混合物 72 を重力により、角 52、53、54 の間の反応路 48 に沿って移動し、第二の反応混合物 72 を更に混合、攪拌するため、それらの角と接触させるため、方向を変えながら更に回転させてもよい。最初の検出可能な応答が得られないか、又は上記のごとく測定に不必要若しくは望ましくない場合、最初の反応混合物 71 は、その代わりに、装置 40 を反時計方向に回転させることにより重力によって反応路 48 に沿って第三の角 54 へ直接移動させてもよいことは明らかである。

同様に、第二の反応混合物 72 は、装置 40 を時計方向に更に回転することによって、第四の角 55 及び試薬帯 83 に接触させられ、上記のごとく、試薬帯 83 に組み入れられた分析試薬と共に第三の反応混合物 73 を形成するために装置 40 を振動させ、必要ならば、上記のごとく、第三の反応混合物 73 をインキュベートするために装置 40 を静止の位置に保持する。典型的には、分析

33

が重力によって第二の角 53 にあるキューベット窓に移動させるために、時計方向に回転され、装置は静止位置に保持される（第 5 e 図）。次いで、最初の反応混合物 71 が示す最初の検出可能な総ての応答は測定され、残りの測定の段階が次に行なわれる。例えば、かかる最初の検出可能な反応は、以下に詳細に記載するように、液体試料が全血液試料、例えば全血液試料中の誘化ヘモグロビンの百分率を測定するような総ヘモグロビンの測定であつてもよい。

最初の検出可能な応答が第二の角 53 で検出され、測定されると、装置 40 は最初の反応混合物 71 を重力により、第二の角 53 から第三の角 54 にある試薬帯 82 へ移動させるために時計方向に回転され、試薬帯 82 に組み入れられた分析試薬と接触し、第二の反応混合物 72 を形成し（第 5 f 図）、必要ならば、装置 40 は、上記のごとく、第二の反応混合物 72 をインキュベートするため静止位置に保持される。好適には、試薬帯 82 中の分析試薬の完全な可溶性又は懸濁を確

32

試験法における最終反応混合物、この場合、第三の反応混合物 73 は、測定され、液体試料中の分析対象物の量に相関される検出可能な応答を提供する、又は、最初に検出可能な応答が上記のごとく提供される場合には、測定され、分析対象物の機能として検出可能な応答に比較される。何れの場合にも、第三の反応混合物 73 は、装置 40 を反時計方向に回転することにより重力により反応路 48 に沿って第二の角 53 に移動させられる（第 5 h 図）、得られた検出可能な応答は、このようにして測定される。

装置 40 は、各種の試料、特に生物学的液体、例えば全血、血漿、プラズマ、尿、唾液、髄液などに関する分析対象物の測定に、この分野で公知の調り測定及び比濁分析が一般に利用され得る。例えば、凝集免疫反応及び凝集阻止免疫反応は、その分析試薬を液体試料及び液体の混合物によって接触さるべき所望の順序で、反応路 48 に組み入れることで行なわれる。

特に、本発明の装置 40 は、ヘモグロビン A1

34

c (Hb A1c)、糖化ヘモグロビン誘導体の測定のための免疫比濁分析試験の実施に有用である。このような試験法によって、全血液試料中のヘモグロビンは、変性したチオシアノーメトヘモグロビンの形に変換され、これは免疫反応による全試料ヘモグロビンの最初の測定、次いで変性したHb A1c型を測定する基礎として利用できる。免疫学的試験法は、抗体粒子試薬及び凝集試薬の特異な相互作用に基づいており、例えば、1987年11月8日に出版された米国特許出願第118,469; 118,476及び118,506号の各明細書に記載されている。

抗体粒子試薬は、水に懸濁可能な粒子（例えば、ポリスチレン又はその他のラテックス）に結合した、変性ヘモグロビンのペプターサブユニットの中の糖化N末端のペプチド配列順序に特異的な抗体又はその断片よりなる。かかる有用なラテックス粒子は、ラテックス凝集免疫試験の分野で熟練した技術者には明らかである。一般に、このような粒子は、試験のために所望の抗体試薬の安定な

35

成され得る。通常、全抗体又はFab、Fab'若しくはF(ab')<sub>2</sub>のようなIgG断片が使用される。抗体試薬は、通常の抗血清及び単クローン技術のような有効な技術の何れかによって導出され得る。

凝集試薬は、抗体試薬に対する多数の抗原決定基の結合位置を含み、凝集免疫試験法の分野でよく知られた技術によって作られ得る。この試薬は、一般的に云えば、抗分析対象物抗体試薬に対する多数の抗原決定基の結合位置よりなる。このような位置は、分析対象物自体、又は試験のために抗体によって結合するに十分な容量を有する適当な類似の物質を用いて求められる。このような類似の物質は、蛋白の分析対象物の場合、合成的に若しくは消化によって作られた適当な断片よりなり、抗体試薬、例えばヘモグロビンA1cの糖化ペプチド基に対する抗原決定基を含んでいる。

上記の試薬は、Hb A1cに対する免疫学的比濁分析試験法を上記及び第5a～5h図に示したごとく、確實に実施するため、装置40に組み込

37

支持体として役立ち、分析目的に有効な凝集試薬の存在で、凝集を起こすために必要な性質を要求する。ラテックス粒子は、一般に、乳化重合又は懸濁重合によって作られる[エル・ヂ・バングス(Bangs, L.G.)著(1984年)、ユニホーム・ラテックス・パーティクル(Uniform Latex Particles)、セラゲン・ディアグノスティックス社(Seragen Diagnostics Inc.)、米国、インディアナ州、インディアナポリス市]。誘導した懸濁重合を使用してもよい[ウゲルスタッドら(Ugelstad, J., et al.); アドバンスド・コロイド・アンド・インターフェイス・サイエンス(Adv. Colloid and Interface Sci)、13: 101-140(1980)]。良質のラテックス粒子は、市販品として入手できる。ポリスチレン粒子は特に有用である。

抗体試薬のラテックス粒子への結合は、適用上の便宜的な技術である。一般に、結合は、共有結合又は非共有結合であり得る。抗体試薬は、全抗体、抗体の断片、多機能抗体の集合体などから構

36

まれ得る。特に、試薬域61は、フェリシアン化カリウムのような酸化剤を乾燥、可溶性形で組み込み得る、リチウムチオシアネートのような凝状の変性剤70は液体供給貯留器30に入れられ、酸化剤と共に、本来のヘモグロビンをそのチオシアノーメトヘモグロビンに変換する；試薬域62には、抗体粒子試薬が乾燥、懸濁可能な形で組み入れられ；試薬域63には、凝集試薬が乾燥、可溶性形で組み入れられる。全血試料又はその前処理試料は、毛細管80に導入され、毛細管ホルダ41は、開放部58を経て装置40に挿入され(図5a図)、図32は、上記のごとく、変性剤70を反応路49に導入するように操作される。

装置40は、最初に反時計の方向に回転し(図5b図)、それに変性剤70が、反応路49に沿って重力により移動して、第一の角52と接触し、試薬域61及び毛細管80に添加された酸化剤は、毛細管80からの血液試料と最初の反応混合物71を形成する。好適には、装置40は、上記のごとく、振動し、次いで最初の反応混合物が重力に

38

よって第二の角 53 に移動させられるように、時計方向に回転し、静止位置に保持される（第 5 a 図）。最初の反応混合物 71 は、第二の角 53 で約 3～5 分間、好適には約 25℃ ないし約 38℃ で好適にインキュベートされ、全ヘモグロビン含量はその吸光度が、好適には約 530 nm で測定して定量される。次いで、最初の反応混合物 71 を重力により第二の角 53 から第三の角 54 における試薬域 82 に移動させるために装置 40 を回転し、試薬域 82 に添加された抗体粒子試薬と接触させ、そこに第二の反応混合物 72 を形成する（第 5 f 図）。上記のごとく、第二の反応混合物 72 をインキュベートするため装置 40 を静止位置に保持し、次いで、装置 40 をさらに時計方向に回転することにより、第二の反応混合物 72 を第四の角 55 で試薬域 83 に接触させ、装置 40 を上記のごとく振動して（第 5 g 図）、試薬域 83 に添加した凝集剤と共に、第三の反応混合物 73 を形成する。抗体粒子試薬及び凝集剤を逐次的又は同時に接触させ得るように、抗体粒子試薬及び

39

試料中に存在する分析対象物の量と関係付けられる。

抗体試薬の抗体成分は、既知の免疫グロブリンのクラス及びサブクラス、例えば IgG、IgM など、又は慣例上、Fab と Fab'、及び F(ab')<sub>2</sub>、又は、より好適には一価の抗体断片（Fab または Fab'）として知られる IgG の一価及び二価の抗体断片の何れかのような全抗体であり得る。二価及び一価の IgG 抗体断片は、ペプシン又はバインによる標準的な蛋白質分解消化法を用いる、この分野で公知の方法によって得られる。

標識された試薬の検出可能な化学的な基は、検出可能な物理的又は化学的性質を有する物質の何れかであり得る。このような物質は、免疫学的試験法の分野でよく開発されてきており、一般に、かかる方法に有利な標識は免疫学的測定試験法に適用することができる。例えば、検出可能な物理的な性質を有する化学的な基は、検出可能なシグナル、例えば蛍光体、燐光性の分子、発色団、放

41

凝集剤は反応路 48 に置かれる。

抗体粒子及び凝集剤が相互に結合し、光散乱複合体を形成する程度は、存在する HbA<sub>1c</sub> の量に因り、比濁分析測定により容易に定量される。従って、HbA<sub>1c</sub> の測定は、次いで装置 40 を反時計の方向に回転させることにより、第三の反応混合物 73 を重力で第二の角 53 に移動させることで行なわれる（第 5 h 図）。第三の反応混合物 73 の濁度は、上記のごとく測定され、第三の反応混合物 73 の比濁分析応答及び第一の反応混合物 71 の全ヘモグロビン測定は、全血試料中の糖化ヘモグロビン百分率に相関させられる。

装置 40 は、分析対象物のうちで結合を含む免疫測定法を実施するのにも有効であり、標識された試薬は、検出可能な化学的な基で標識された抗分析対象物抗体試薬、及び分析対象物又はその結合類似体の固定した形態よりなる。このような分析法によって、液体試料からの分析対象物又は分析対象物の固定した形態に結合している分析対象物への、標識された抗体試薬の結合量は定量され、

40

射性同位元素、スピン標識、又は電気的に活性な部分、を呈する化学反応又は他の化学品若しくは物質との相互反応を必要としない、それら自身の物理的性質を基礎にして検出される基である。検出可能な化学的な性質を有する化学的な基は、検出可能なシグナルを呈するそれら自体の化学反応性、又は検出される成分との相互作用に基礎を置いて検出される基である。検出可能な化学的性質を有する、このような化学的な基は、かかる検出される成分との相互作用に先立って検出可能な生成物を生ずることなく、又は検出可能なシグナルを呈することなく、酵素的に活性な基、例えば酵素、酵素基質、補酵素、酵素阻害及び活性物質、化学発光物質、化学的触媒、金属触媒、酵素チャネリング化合物、含酵素化合物—抑制剤、又はエネルギー転移剤、及びビオチン又はハオプテンのような特異的に結合可能なリガンドを含むものである。

分析対象物又はその結合類似物の固定した形態は、この分野で公知の方法によって反応路の表面

42



に固定又は結合、又は上記のごとく固定した形態として試薬のパッド又はフィルムに添加され得る。或いは、分析対象物又はその結合親縁体は、通例、常磁性体又は常磁性と呼ばれる永続性の磁化を受けることなく、磁氣的に磁場に応答反応を示す試薬粒子に固定される。例えば、このような常磁性の性質は、結晶のサイズが約300Å以下の酸化鉄の場合に、特徴的に明らかにされているけれども、結晶のサイズが約500Åより大きい酸化鉄は、永続性の磁化を生ずる磁場への反応性によって特徴付けられる。従って、このように磁氣的に反応する試薬粒子を、永続性に磁化されることなく磁場に置くことができる、そうでないと、免疫学的測定を実施している間に好ましくない磁石の凝集が起こることになる。

このような磁氣的に反応する粒子は、この分野では公知であり、市販品として入手できる、さもないればこの分野で公知の方法で作ることができる。例えば米国特許第 4,335,094号の明細書は、磁性の物質を置いた格子又は孔を有するポリマー

43

結合させる場合、該粒子は多機能であるか、又は、例えばこの分野で公知の共有結合性のカップリング法[参考例、クアトレカサス(Cuatrocasas)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.); 245, 3059(1970)]によって具体化され得る官能基で、多機能化され得るべきである。官能基の例は、カルボン酸類、アルデヒド類、アミン類、アミド類、マレイニイミドのような活性化されたエチレン類、ヒドロキシル類、スルホン酸類、メルカプタン類などである。例えば、分析対象物及びその他の生物学的分子の、アガロース及びポリアクリルアミド類へのカップリングは、ヤコビイ及びウィルチェック(W.B. Jacoby and M. Wilchek)著、メソッド・イン・エンチモロギイ(Method in Enzymology) 34巻、アカデミック出版(Academic Press)、ニューヨーク(1974)に記載されている。

本装置を使用する免疫学的測定試験法は、上記のごとく反応路48に沿って免疫学的測定試験用

45

を使用する方法；米国特許第 4,339,337 及び 4,358,388 号の各明細書は、ビニル芳香族ポリマーで取り巻かれた磁極鉄心を使用する方法；米国特許第 4,452,773号の明細書は、生物学的分子に共有結合するための、付属の官能基を有する多糖類で覆われたコロイドの磁性酸化鉄を使用する方法；及び、米国特許第 4,554,088及び 4,628,037号の各明細書は、一般にシランで被覆された酸化鉄心を使用する方法を記載している。

好適には、このような均一なラテックス粒子は、重力による有意な沈殿なしに、水性の媒質に分散又は懸濁でき、そのため、絶え間なく攪拌することなく反応混合物中に懸濁状態が維持、即ち、水懸濁性がある。従って、ブラウン運動及び容積に対する高い面積比と共に、有効で急速な結合の動力学が確保される。

分析対象物又はその結合親縁体は、この分野で公知の方法によって常磁性の粒子に固定させることができる。例えば、分析対象物又はその結合親縁体を磁氣的に反応する試薬粒子に共有結合的に

44

試薬を組み入れることによって実施し得ることは、前記の要件を了承している、この分野に精通している技術者には明らかである。装置40が、このような免疫学的測定試験の実施に使用される場合、緩衝剤、希釈剤などが、液体供給貯留器30に含まれ、適当な時間に反応路49に導入される。或いは、標識された試薬の検出可能な化学的な基が、酵素標識のような検出可能な化学性質を有する場合、液体供給貯留器30は、かかる化学的な基に対する検出性の成分、例えば酵素に対しては発色体の基質を含有する液体試薬が組み入れられ、標識された試薬の酵素成分と反応して検出可能な応答を提供するために試験の終末に反応路49に導入される。

本カセット装置は、カセットの反応路内で作られる液体混合物に含まれる各種の試薬及び物質の重要な攪拌を可能にする流動攪乱手段よりなる。装置について、上記の例で示したように、このような流動攪乱手段は、反応路の壁にある角又は集合点を形成する反応路の壁部であり得る。このよ

46



うな角は、一般に約75度ないし約105度の角度をなしているが、約90度の角度が特に有効であることが判った。

角の他に、流動攪乱手段は、一般に所望の混合の結果を得るために反応路に沿って液体の流動の方向を変える、何れかの反応路の構造を含む。例えば、流動攪乱手段の別な形態は、障害物と遭遇して液体の流動を偏向させ、方向を変化させ、又は適当に方向を変えるために、反応路に置かれた障害物で、ほとんど何であってもよい。このような障害物は、反応路を形成している周辺の壁から上方に垂直に張り出した固体のバッフル又はダム構造で、路の幅全部を横断し得る。このバッフルの高さは、通例、液体混合物の高さより低く、液体混合物が反応路に沿って流れるにつれてバッフルの上端に溢れる程度にしてあり、それによって攪乱又は混合作用を生ずる。あるいは、固形のバッフル又はダムよりも、バッフルによって液流を制限し、必要な攪拌作用を行なわすバッフル壁に開口又は垂直若しくは水平の細孔を有する穿孔

47

装置は、本装置と同様に非遠心的な混合の原理で作用するが、一般に円形で、ここに意図するとき攪動攪乱手段を備えるものではない。この装置を“円形カセット”(Round Cassettes)と呼ぶ。

(c) 完全に混合された液体の反応混合物を加え測定を行なった。対照として使用したキュベット[“対照キュベット”(Control Cuvettes)]。

実施した測定は、上記のHbA1cに対する比濁測定免疫試験であった。各種のカセットにおける混合度は、カセット内で実施した免疫試験の精度を測定することで評価した。混合を完全に行なうことによって、免疫学的試験法から時間依存性及び非再現性の要素を排除し、良好な測定精度が得られた。円形及び正方形カセットの場合、抗体-ラテックス及び凝集剤は、分解された装置の個々の装置内の適当な区域に、液体の形態で配置された。例えば正方形カセットでは、乾燥した試薬、抗体-ラテックスは試薬域62に、凝集剤は試薬域63に配置した(第3図参照)。次に、これら

48

のある構造を形成してもよい。流動攪乱手段は、また周囲の壁から上方に、又は側壁から横断して、又は両者を組合せた多様な構造を取り得る。流体力学の分野において精通した技術者及び研究者は、その他の構造の障害物、及びカセット装置を模倣させて反応路で所望の攪拌を起こし、従って本発明の流動攪乱手段として役立つその他の形態の障害物を設計することも可能である。

本発明の適当な流動攪乱手段を使用することで、液体試料混合物における混合の程度を有意に改善することが、実験的に証明されてきた。一つの実験で、以下の間で比較を行なった：

(a) 本出願書の第3、4、5図によって作られた装置、従って、流動攪乱手段を含む[この装置を“正方形カセット”(Square Cassettes)と呼ぶ]。

(b) 本出願に優先権がクレイムされている、1988年4月11日に出願された米国特許出願第179,843号の図面の第1、2、3、4図、及び関連本文記載の方法によって作られた装置[この

48

の装置は、上記のごとく、組み立てられた。

正方形及び円形カセットで免疫試験を実施するに際し、変性剤の約0.5 mL溶液を装置に添加し、二つの型の装置に対するそれぞれの操作方法に従って、血液試料及び免疫学的試験試薬と混合した。対照キュベットには、装置内に変性剤を最初に添加し、試料と混合した。その後、免疫試験試薬を完全に混合した液体の形態で加えた。次いで、すべてのカセットにおける凝集応答を比濁度測定装置で測定した。各型について、多回試行の結果から変動係数(CV)を算出した。これらの結果を下記の表Aに示す：

表 A

装置の型	CV (%)
対照	1.4
円形カセット	3.8 ~ 11.9
正方形カセット	1.5

結果はこの範囲で広範に変化した。

以上の実験結果は、本発明の流動攪乱手段の使用が、有意に攪拌、及び試験の精度(円形カセット

50

に対する正方形カセット)を改修し、それによって達成された精度が、予め混合した液体試薬を使用した場合に得られた精度と大体一致していることを示した。

本発明は、広範な各種の試料中の分析対象物の検出又は測定に適用され得る。物質の形態が如何なるものであっても、液体であるか、又は抽出、溶解、懸濁などによって液体の状態に移行し得られるものであれば、試料として供せられる。通常、試料は、実際に液体であり、生物学的な液体、例えば血液、血清、プラズマ、尿、脊髄液、唾液、綿棒で集めた標本の抽出物、喀痰などである。産業上の、食物の、及び環境の液体のような非生物学的な試料も、調査分析処理することができる。液体の試料は、試料の前処理、例えば希釈、濾過、濃縮、化学的処理などの結果であってもよい。これらすべては、この分野の技術の範囲内のものである。

上記の分析検定法は、各種の分析対象物の測定に使用することができる。分析対象物は、通常、

51

膜であり、限定するものではないが、アポリボ蛋白質-A I 及びアポリボ蛋白質-B I O O のようなアポリボ蛋白質である。特別な蛋白質の例は、ブレアルブミン、 $\alpha$ -リボ蛋白質、ヒト血清アルブミン、 $\alpha$ - $\alpha$ 糖蛋白質、 $\alpha$ - $\alpha$ -アンチトリプシン、 $\alpha$ - $\alpha$ -糖蛋白質、トランスコルチン、チロキシン結合グロブリン、ハプトグロビン、ヘモグロビン、ヒトヘモグロビンの $\beta$ -サブユニット中の糖化ペプチド配列、ミオグロビン、セルロプラスミン、 $\alpha$ - $\alpha$ -マクログロブリン、 $\beta$ -リボ蛋白質、エритроポエチン、トランスフェリン、ヘモペキシン、フィブリノゲン、Ig G、Ig M、Ig A、Ig D 及び Ig E のような免疫グロブリン、及びそれらの断片、例えば Fc 及び Fab' 補体因子、プロラクチン、血餅因子例えばフィブリノゲン、トロンビンなど、インシュリン、メラノトロピン、ソマトトロピン、チロトロピン、濾過成熟ホルモン、リユーティナイジングホルモン (leutinizing hormones)、ゴナドトロピン、生殖腺刺激ホルモン、ヒト絨毛膜性生殖腺刺激ホルモ

53

結合する物質が存在し、生物学上の系で生産、若しくは合成されるペプチド、ポリペプチド、蛋白質、炭水化物、糖蛋白質、ステロイド、核酸又はその他の有機分子である。分析対象物は、機能的な表現をすれば、抗原、ハプテン、相補ポリヌクレオチド配列、ホルモン、ビタミン、代謝物及び薬理学上の薬剤である。通例、分析対象物は、通常約 1,000 ないし約 10,000,000 の分子量を有する免疫学的に活性なポリペプチド又は蛋白質、又は少なくとも約 100、通常約 1,500 以下の分子量を有するバプテンである。

代表的なポリペプチド分析対象物は、アンギオテンシン I 及び II、C-ペプチド、オキシトキシン、バソプレジン、ニューロフィジン、ガストリン、セクレチン、ブラヂキニン及びグルカゴンである。

代表的な蛋白分析対象物の例は、プロタミン、ムコ蛋白質、糖蛋白質、グロブリン、アルブミン、硬蛋白質、燐蛋白質、ヒストン、リボ蛋白質の部

52

ン、甲状腺刺激ホルモン、胎盤泌乳刺激ホルモン、内因子、トランスコバラミン、血清酵素例えばアルカリ性ホスファターゼ、乳酸脱水素酵素、アミラーゼ、リパーゼ、ホスファターゼ、コリンエステラーゼ、グルタミン酸オキサリ酢酸アミノ基転移酵素、グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素及びウロペプシン、エンドルフィン、エンケファリン、プロタミン、組織性抗原、細菌性抗原、ウイルス性抗原、例えば肝炎に関連した抗原 (例へば、B型肝炎表面抗原、B型肝炎コア抗原、及びB型肝炎Be抗原)、及び腫瘍標識 (例へば、癌胚抗原、 $\alpha$ - $\alpha$ -フェトプロテイン、前立腺酸性ホスファターゼ、前立腺特異抗原、ニューロン特異エノラーゼ、エストロゲン受容器、癌抗原 125、癌抗原 19-9 など) である。

代表的なバプテン分析対象物の例は、薬剤、代謝物、ホルモン、ビタミン、毒素、及び同様な有機化合物の一般的な部類である。ハプテン系ホルモンの例は、チロキシン及びトリヨードチロニンである。ビタミンの例としては、ビタミン A、B、

54

例えばチアミン、ビタミンB<sub>1</sub>、C、D、E及びK、及び葉酸である。薬剤の例としては、アミノ配糖体、例えばゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、シソミシン、カナマイシン、及びネチルミシン、ペニシリン、テトラサイクリン、テラマイシン、クロロマイセチン、及びアクチノマイセチンのような抗生物質；ヌクレオシド類及びヌクレオチド類、例えばアデノシン二磷酸（ADP）、アデノシン三磷酸（ATP）、フラビンモノヌクレオチド（FMN）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）、及びその磷酸誘導体（NADP）、チミジン、グアノシン及びアデノシン；プロスタグランジン類；エストロゲンのようなステロイド、例えばエストリオール及びエストラジオール、ステロゲン類、アンドロゲン類、ジゴキシニン、ジギトキシゲニン、ジギトキシン、ジゴキシゲニン、12-O-アセチルジゴキシゲニン、及び副腎皮質ステロイド類；及びフェノバルビタール、フェニルトイン、ピリミドン、エトスキシイミド、カルバマゼピン、バルプロア

55

光免疫試験法（SLPIA）；米国特許第4,134,782号の明細書に記載された酵素阻害剤標識の免疫試験法；米国特許第3,817,837及び4,043,872号の各明細書に記載された酵素増加の免疫学的試験法（EMIT<sup>®</sup>）；米国特許第4,708,929号の明細書に記載されたクローンとして発生させた酵素供与体免疫学的試験法（CEDIA<sup>®</sup>）；及び、米国特許第4,510,251号に記載された蛍光分極免疫学的試験法（TDX<sup>®</sup>）などである。

本装置は、上記のごとく手動で操作され、一種以上の反応混合物から得られる検出可能な応答は、この分野で公知の光学機器、例えば透過、吸収又は散乱などにより検出され、測定される。本体部分及び蓋部は、少なくとも観察する区域として選ばれた角の区域は、反応混合物の光学的測定が可能な観察窓として利用するために透明なように作られるのは当然である。装置を手動で操作する場合、オペレーターが液体試料の運動及び位置を観察し得るように、支持壁及び蓋部は、その全部に

57

ート、テオフィリン、カフェイン、プロプラノロール、プロカインアミド、キニジン、アミトリプチリン、コルチソール、デシブラミン、ジソピラミド、ドキセピン、ドキシソルピシン、ノルトリプチリン、メトトレサート、イミプラミン、リドカイン、プロカインアミド、N-アセチルプロカインアミド、アムフェタミン類、カテコールアミン類、及びアンチヒスタミン類のようなその他の薬剤である。母薬の例は、アセチルT-2トキシン、アフラトキシン、コレラトキシン、シトリニン、サイトカラシン、ブドウ状球菌のエンテロトキシンB、HT-2トキシンなどである。

さらに、本発明の装置は、特に上記の試験法の実施に限定するものではなく、この分野で公知のその他の各種の試験法を実施するための分析試薬を組み込むこともできる。例えば、このようなその他の試験法は、限定するものではないが、米国特許第4,238,565号の明細書に記載されたアポ酵素再活性化免疫試験系（ARIS）；米国特許第4,279,992号の明細書に記載された基質標識の

56

ついて実質的に透明であることが好ましい。

好適には、装置は、単純に機械的、非遠心的な回転装置で操作される。この装置は、全部の図面で大体垂直に配置しているように示されており、上記のごとく非遠心的に回転又は振動する。回転する装置は、例えば、電気的なステッピングモーターによって操作される。このモーターは、順次、所望の方向に所望の順序で装置を回転、インキュベーションの間の静止位置、及び一種以上の検出可能な応答の検出と測定についてプログラムされたマイクロ処理装置によって調節される。このような機械的な装置は、検出可能な応答を検出し、測定する光学系、例えば透過、吸収又は散乱光学系を含んでおり、これは、器械装置内で、実質上、装置の水平な回転軸、即ち装置の角と一直線に置かれている。この器械装置は、個々の試験プロトコールにおける要求に応じて、液体試料又は反応混合物を加熱するための加熱部分、例えば固定加熱器又は凸凹の接触点を有する回転接触板、及び装置を器械装置の中に適当に配置するための光学

58

センサーよりなる。好適には、各組の機械ならびに電気的構成部品は、都合の良い大きさのケースに収容される、例えば、一個の装置又は、一種以上の液体試料に対する試験プロトコールを同時に実施することが望ましい場合、本発明の装置の一個以上を収容するための溝または開放部よりなるケースである。

本発明の装置は、型に入れて作られ、又はこの分野で公知の型に取る材料、例えば、限定するものではないが、ガラス、プラスチック、例えばポリスチレン、アクリリック、ポリエチレン、テトラフタレート、ポリカーボネートなどから作られる。水和性若しくは親和性の素材が好ましいが、上記のごとく予め処理された非水和性若しくは疏水性の素材も使用し得ることは明らかである。

液体試料が導かれ移動する機能性の壁の配置は、図示のように限定するものではなく、修正され得る。但し、壁が液体試料を支持し移動させるのに役立つことは明らかである。例えば、第3及び4図に示した装置40を参照して、側壁

59

反応路とその拡張路との間に開放の液体流動通路を備えることになる。

特別な用途のために、さらに変更及び修正を行なうことは明らかである。例えば、測定が完了すると、装置内にある液体混合物の最大量を吸収させる目的で、多量の吸収剤をカセットの中に配置する。この方法では、処分の時点では、自由に流動する液体は装置内に残らず、そのため汚染物の侵入、又は装置からの望ましくない漏洩若しくはこぼれの危険は軽減される。吸収剤は、例えば反応路の一方に末端に置かれ、測定の終了時に、液体が吸収剤と接触するように装置を回転する。例えば、このような吸収手段は、隙間がホルダの中に形成されている毛細管ホルダ41の中空の部分に置かれ、カセットの回転によって、液体は中空部分に流入する。また、装置の外部は、回転する装置内で正確な挿入及び調整を確保する主要な要素で作り上げられている。

ここに記載した本発明は、この発明の精神と範囲に反することなく、種々に変更及び修正するこ

61

44及び内壁45、46、50は、液体試料を支持し、ある方向に導くために溝様の経路又は導管となるように形成されたV字型、U字型若しくはその他の型をなしている。さらに、支持壁47は、蓋部43と同様に別の要素として設備されており、第一及び第二の内壁45と46及び内壁50は、側壁44と共に全体を構成する要素を成し、別の支持壁47及び蓋部43によって閉ざされている。このように隔離した支持壁47及び蓋部43は、薄く柔軟な膜、フィルム若しくは薄いプラスチック製品の形態で、側壁44に溶媒密着、レーザー密着、超音波密着、接着又は付着し得る。装置40を修正し、本体42と大体同じ寸法を有する別な開放本体部を含むことができるし、本体部42が蓋部43によって閉鎖され、又は別の蓋部43で閉鎖されたのと同様に、本体部42の支持壁47で閉鎖するように設備しても良い。このような別の本体は、別の分析試薬を収容するために、例えば支持壁44に出入口又は開放部を設けることによって反応路48を拡張してもよい。これは、

60

とが可能であり、従って、特許請求の範囲によって指示した場合にのみ、このような限定が付けられることは明らかである。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の例示的な装置の正面図である。

第2図は、第1図に示した装置の底面図である。

第3図は、本発明の好適な態様を示す分解正面図である。

第4図は、第3図に示した装置の側面図である。

第5a～5h図は、第3図及び第4図の好適な装置の一連の正面図であり、この装置を使用して分析試験法の実施を説明する。

62

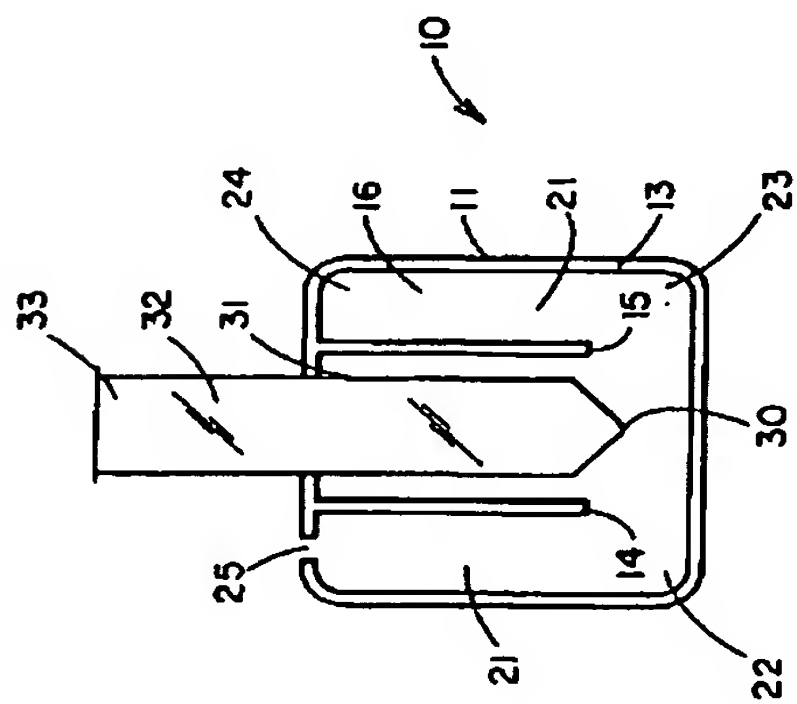


FIG. 1

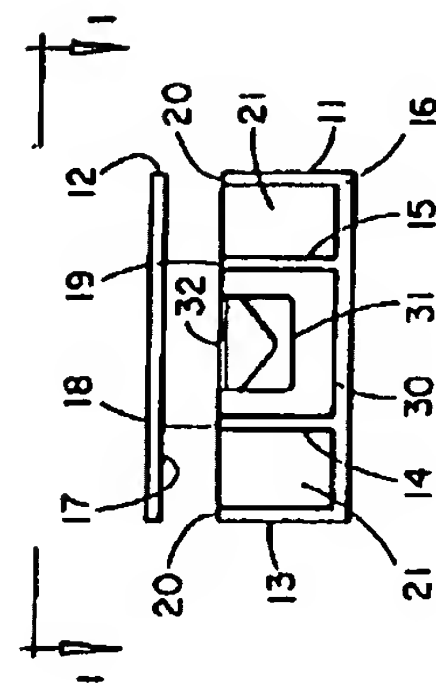


FIG. 2

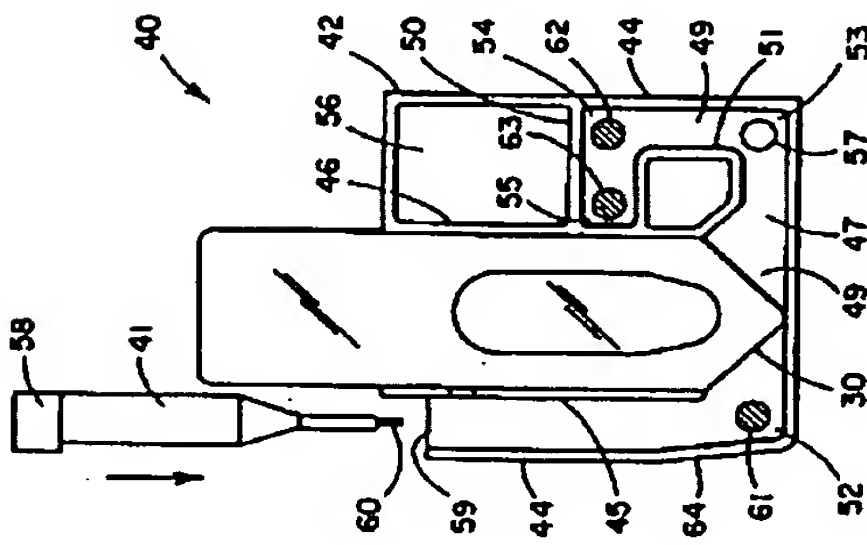


FIG. 3

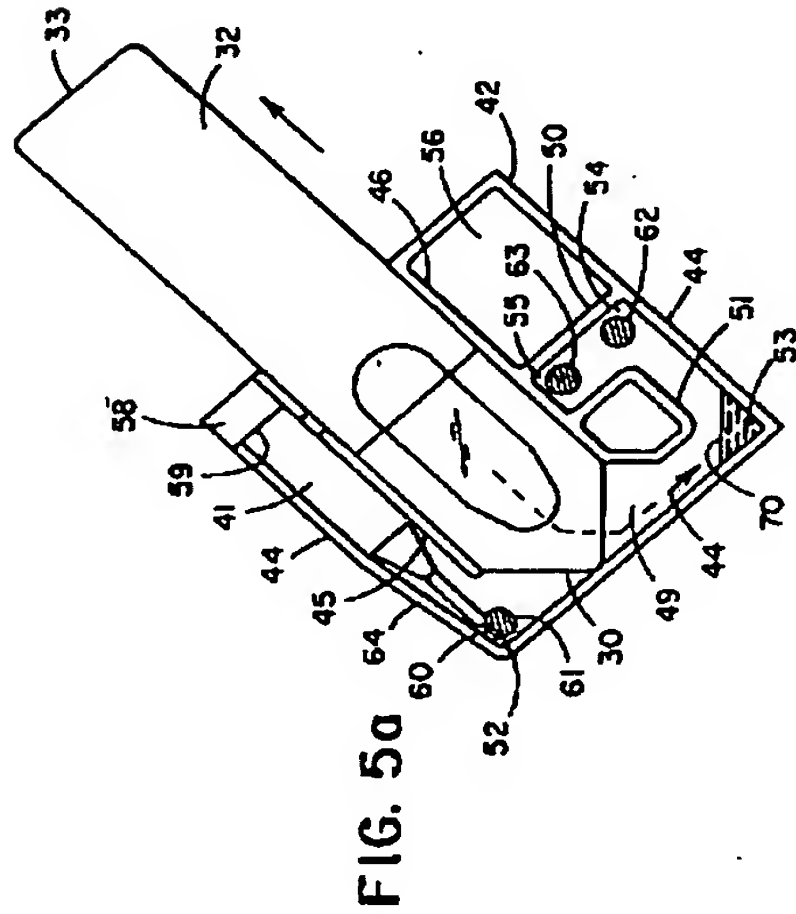


FIG. 5a

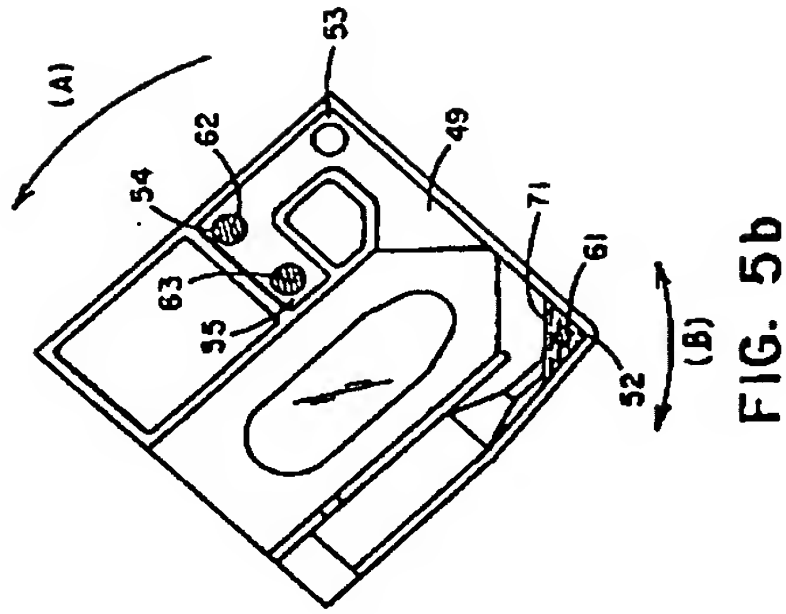


FIG. 5b

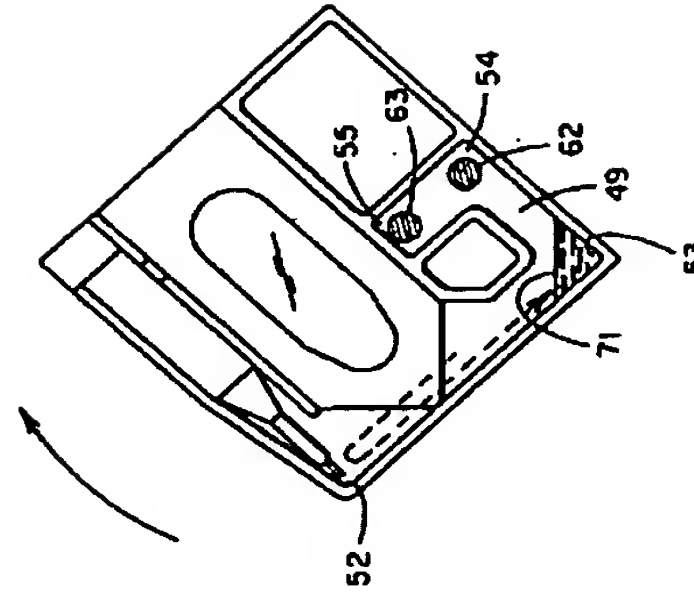


FIG. 5c

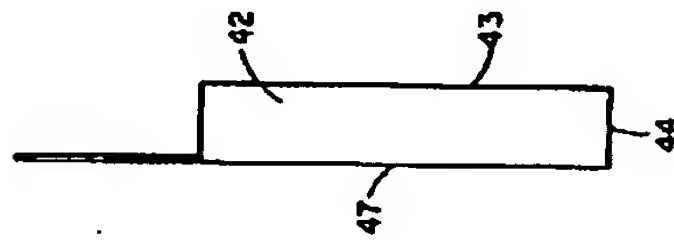


FIG. 4



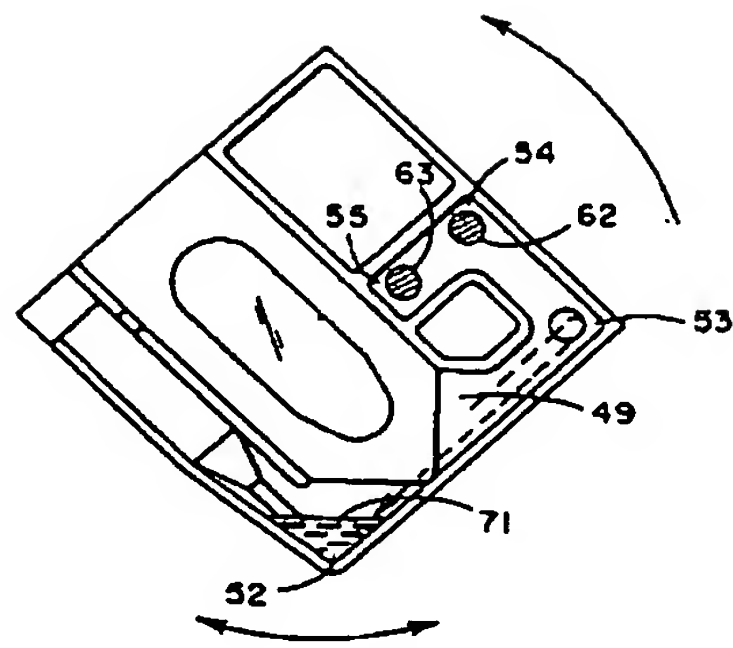


FIG. 5d

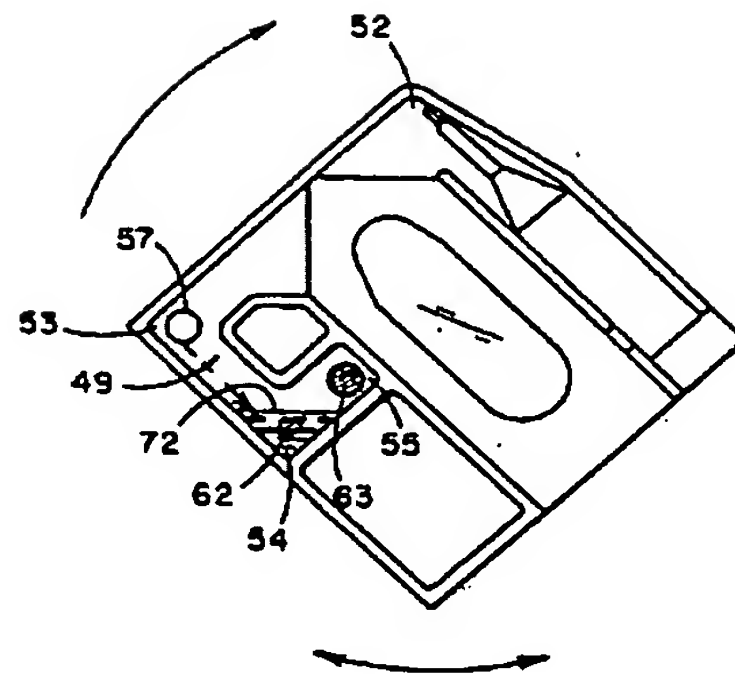


FIG. 5f

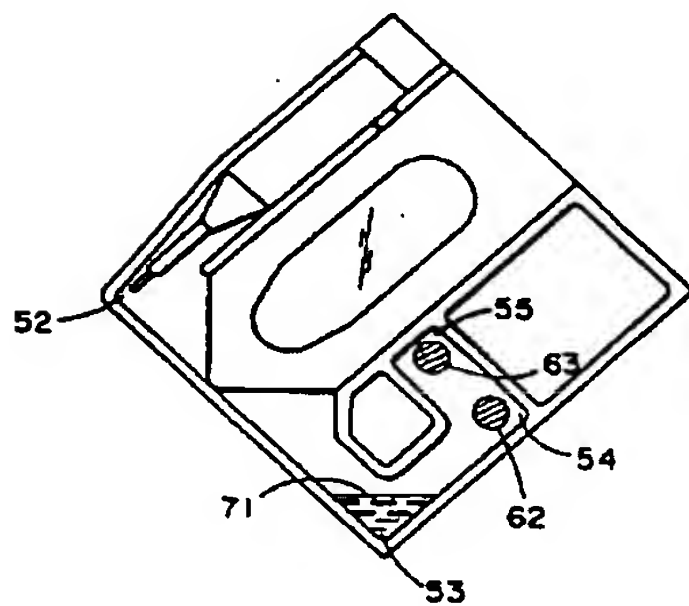


FIG. 5e

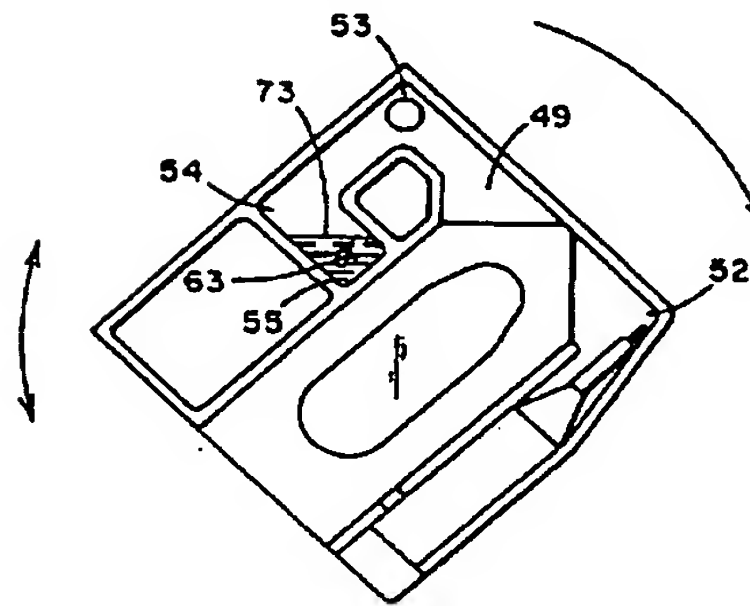


FIG. 5g

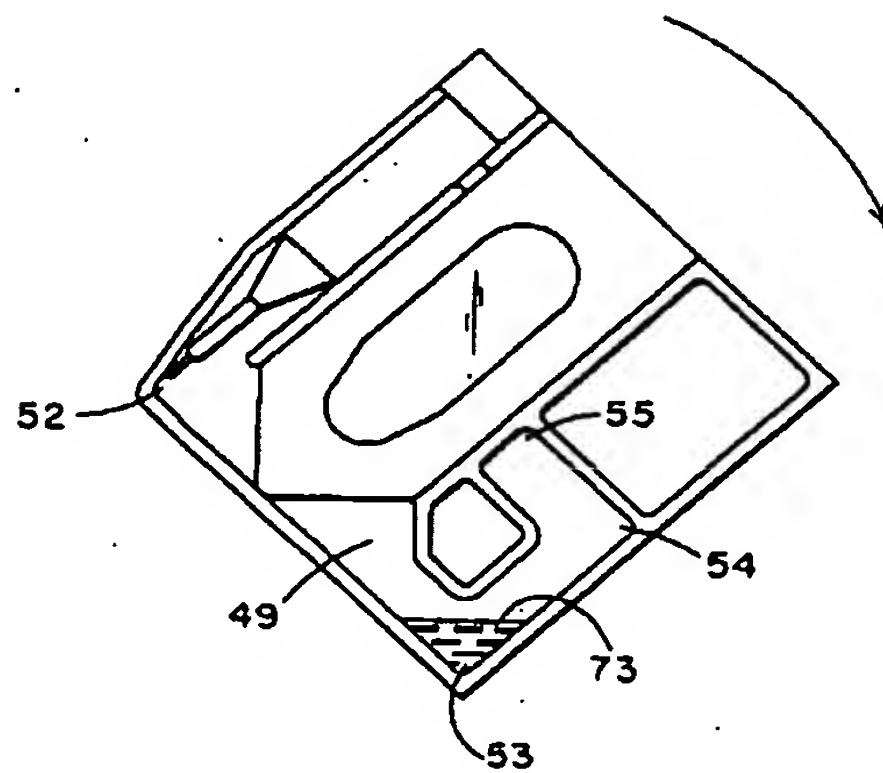


FIG. 5h

第1頁の続き

- |      |                 |   |
|------|-----------------|---|
| ⑫発明者 | クリスティン・デイ・ネルソン  | アメリカ合衆国、ミシガン州、49112、エドワーズバーグ、ビー・オー・ボックス 551、レイク・ストリート 68972 |
| ⑬発明者 | フランク・ダブリュ・ウオゴマン | アメリカ合衆国、インディアナ州、46530、グレンジャー、レッドストーン 50939                  |
| ⑭発明者 | キンーフアイ・イツブ      | アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、エルクハート、クリークヘイブン・ドライブ 51194            |

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第6部門第1区分  
 【発行日】平成10年(1998)12月22日

【公開番号】特開平3-46566  
 【公開日】平成3年(1991)2月27日  
 【年通号数】公開特許公報3-466  
 【出願番号】特願平2-179709  
 【国際特許分類第6版】

G01N 33/543 587  
 33/536

【F I】

G01N 33/543 587  
 33/536 F



特 許 補 正 書

平成 9 年 5 月 28 日

特許庁長官 寛井 秀光 殿

1. 事件の表示

平成02年特許第178709号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 マイルス・インコーポレーテッド

3. 代理人

住 所 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目2番12号  
 S V A X T S ビル

氏 名 井上 (7886) 雄 国 際  
 TEL.(3502)7212



4. 補正命令の口付 日 月

5. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲の欄

6. 補正の内容 別紙のとおり

(別紙)

特許請求の範囲

1 実質的に水平な回転軸を具備し、

(1) 液体試料を、反応カセットに導入する注入手段、並びに

(2) 該注入手段と開放液体流通関係にあって、(i) 分析対象物と相互作用して、該分析対象物の関数として検出可能な応答を生ずる分析試薬を組み込んだ試薬域、及び(ii) 接触して該液体を攪拌するに充分な、該反応路に沿った重力により該液体の流動を攪乱する手段(それにより、該反応路で処理された液体は、該反応器を該水平軸の周囲に回転させることによって、該反応路に沿った重力で移動させられ、該試薬域及び該流動攪乱手段に接触できる)からなる反応路を含むことを特徴とする、分析反応を行なって液体試料中の分析対象物を測定するための分析用反応カセット。

2 (a) 液体試料を、その注入手段により反応カセットの反応路に導入し、該反応路内で液体反応混合物を形成する工程；

(b) 該液体混合物を、該反応路に沿った重力により移動させて、反応域で分析試薬と接触させ、流動攪乱手段と接触させるため、該反応カセットをその水平軸の周囲に回転させる工程；

(c) 該水平軸の周囲で該反応カセットを振動させて、該混合物中で該液体混合物と分析試薬を完全に混合するに充分な程度、該流動攪乱手段と接触させて該液体混合物を攪拌する工程；及び

(d) 該液体混合物内で検出可能な応答を測定する工程を含む、請求項1記載の反応カセットを使用して、液体試料中の分析対象物を測定する分析反応方法。